

⑫ 公表特許公報 (A)

昭63-503150

⑬ 公表 昭和63年(1988)11月17日

⑭ Int. Cl. ⁴	識別記号	庁内整理番号	審査請求	未請求	
C 08 F 220/56	MNC	A-8620-4J	予備審査請求	未請求	部門 (区分) 3 (3)
A 61 K 39/385		7252-4C			
C 08 F 8/00	MF X	7167-4J *			(全 12 頁)

⑮ 発明の名称 ポリアミド樹脂及び免疫診断用試薬の調整法

⑯ 特 願 昭62-502824

⑰ 翻訳文提出日 昭62(1987)12月28日

⑱ 出 願 昭62(1987)4月29日

⑲ 国際出願 PCT/US87/00971

⑳ 国際公開番号 WO87/06594

㉑ 国際公開日 昭62(1987)11月5日

優先権主張 ㉒ 1986年4月30日 ㉓ 米国 (U S) ㉔ 858,216

㉕ 発 明 者 カング, バトリック アメリカ合衆国テキサス州78250, サン・アントニオ, ボーウエンズ・クロッシング 8119

㉖ 出 願 人 サウスウエスト・ファウンダー ション・フォー・バイオメディカル・リサーチ アメリカ合衆国テキサス州78284, サン・アントニオ, ビー・オー・ボックス 28147

㉗ 代 理 人 弁理士 湯浅 恭三 外4名

㉘ 指 定 国 A T (広域特許), A U, B E (広域特許), C H (広域特許), D E (広域特許), D K, F R (広域特許), G B (広域特許), I T (広域特許), J P, L U (広域特許), N L (広域特許), S E (広域特許)

最終頁に続く

請 求 の 範 囲

(1) 水溶液中でジメチルアクリルアミドモノマーと官能性モノマーとを共重合することによって、ジメチルアクリルアミドモノマーを架橋し;

有機溶媒中で前記水溶液を $\xrightarrow{\text{SL}}$ 化し;および

開始剤と促進剤とを加えることによって生成したポリアミド樹脂ビーズを単離する工程;

を含む固相 $\xrightarrow{\text{SL}}$ 合成用ポリアミド樹脂の製造方法。

(2) ジメチルアクリルアミドモノマーをジアミノアルカンによって架橋する請求の範囲第1項記載の方法。

(3) ジアミノアルカンがN,N'-ビスアルケノイル-ジアミノアルカンである請求の範囲第2項記載の方法。

(4) ジアミノアルカンを、N,N'-ビスアクリリル-1,3-ジアミノプロパン;N,N'-ビスアクリリル-1,3-ジアミノエタン;N,N'-ビスアクリリル-1,3-ジアミノブタンまたはN,N'-ビスアクリリル-1,3-ジアミノヘキサンからなる群から選択する請求の範囲第3項記載の方法。

(5) 官能性モノマーがアルケニルアミンである請求の範囲第1項記載の方法。

(6) アルケニルアミンがさらに保護基を含む請求の範囲第5項記載の方法。

(7) 保護基がビーズに塩基を接触させることによって除去される請求の範囲第5項記載の方法。

(8) 保護基がメチルスルホニルエチルカルボニル基である請求の範囲第6項記載の方法。

(9) 開始剤がリボフラビンまたは過硫酸塩である請求の範囲第1項記載の方法。

(10) 開始剤が過硫酸アンモニウムである請求の範囲第1項記載の方法。

(11) 有機溶媒がヘキサンと四塩化炭素との混合物である請求の範囲第1項記載の方法。

(12) 水溶液をソルビタンモノラウレート、ソルビタンモノデカノエートまたはソルビタンセスキオレートによって乳化する請求の範囲第1項記載の方法。

(13) 促進剤がN,N,N',N'-テトラメチルエチレンジアミンを含む請求の範囲第1項記載の方法。

(14) ビーズを浮遊、洗浄および乾燥によって単離する請求の範囲第1項記載の方法。

(15) リンカーをポリアミド樹脂に結合させることをさらに含む請求の範囲第1項記載の方法。

(16) リンカーがオキシアルキル安息香酸誘導体である請求の範囲第15項記載の方法。

(17) リンカーがBoc-グリニル-4-(オキシメチル)安息香酸である請求の範囲第15項記載の方法。

(18) 請求の範囲第1項記載の方法に従って製造したポリアミド樹脂。

(19) 塩化メチレン中で樹液すると、その乾燥床体積の約2.5倍になり;

約8%-約12%が架橋し;

樹脂1gにつきアリルアミン約50-約400 μ molを含有し;

アミド結合によって樹脂に結合した時に、樹脂1gにつきアミノ酸約0.1-約0.5 μ molと置換しうる;および
負荷した時に、未反応遊離アミンを有しないこと;
を特徴として含むポリアミド樹脂。

(20) ビーズの直径が約180 μ 未満であることをさらに特徴とする請求の範囲第19項記載のポリアミド樹脂。

(21) ポリアミド樹脂を製造し;

ポリアミド樹脂上に~~アミド結合~~^{アミド}を合成し;および

哺乳動物をポリアミド樹脂-~~アミド結合~~^{アミド}複合体によって免疫化する段階;

から成る哺乳動物に免疫原反応を誘発する方法。

(22) ポリアミド樹脂が架橋ポリジメチルアクリルアミド樹脂である請求の範囲第21項記載の方法。

(23) ポリアミド樹脂にリンカーを介して蛋白を結合させることによって、ポリアミド樹脂上に蛋白を合成する請求の範囲第21項記載の方法。

(24) リンカーがオキシアルキル安息香酸誘導体である請求の範囲第23項記載の方法。

(25) リンカーがBoc-グリシル-4-(オキシメチル)安息香酸である請求の範囲第23項記載の方法。

(26) 哺乳動物をアジュバンド中のポリアミド樹脂-~~アミド結合~~^{アミド}複合体によって、免疫化する請求の範囲第21項記載の方法。

(27) ポリアミド樹脂を製造し;

蛋白をポリアミド樹脂上に合成して、ポリアミド樹脂-蛋白複合体を形成する;

蛋白と特異的に結合しうる抗体を含むと思われる体液にポリアミド樹脂-蛋白複合体を接触させる;および
結合した抗体を検出する段階;

から成るインビトロ診断検定方法。

(28) ポリアミド樹脂-蛋白複合体を血清との接触前に固相に吸着させる請求の範囲第27項記載の方法。

(29) ポリアミド樹脂製造工程が次の段階:

水溶液中でジメチルアクリルアミドモノマーと官能性モノマーとを共重合することによって、ジメチルアクリルアミドモノマーを架橋し;

有機溶媒中で前記水溶液を乳化し;および

開始剤と促進剤とを加えることによって生成したポリアミド樹脂ビーズを単離する段階;

を含む請求の範囲第27項記載の方法。

(30) ポリアミド樹脂が次の特徴:

塩化メチレン中で膨潤すると、その乾燥床体積の約2.5倍になり;

約8%-約12%が架橋し;

樹脂1gにつきアリルアミン約50-約400 μ molを含有し;

アミド結合によって樹脂に結合した時に、樹脂1gにつきアミノ酸約0.1-約0.5 μ molと置換しうる;および

負荷した時に、未反応遊離アミンを有さない;ならびに

前記ポリアミド樹脂に蛋白が結合する特徴;

を有することから成るインビトロ診断検定方法。

明 細 書

発明の名称

ポリアミド樹脂及び免疫診断用試薬の調製法

発明の背景

本発明は実験動物に免疫反応を誘発する合成ペプチドと蛋白質の合成と利用に関する。さらに詳しくは、本発明はポリアミド樹脂、同ポリアミド樹脂の製造方法、同樹脂上に合成したペプチドまたは蛋白質から成る複合体を用いた実験動物での免疫反応誘発方法、および同樹脂の免疫診断への利用方法に関する。

固相ペプチド合成は蛋白質の構造と作用機序を研究するための貴重なツールである。大抵のこのような合成方法はアッセンブリー中に通常はリンカー分子によってペプチドを固定する固相としての架橋ポリスチレンベース樹脂の利用を含む。アッセンブリーは固相に保護アミノ酸を加える、同アミノ酸上の保護基を選択的に除去する(脱保護)、および適当に保護されたアミノ酸をさらに加えることから成る繰返しサイクルによって、得られる(参考のためには、ビー.ビー.メリフィールド(B.B. Merrifield)の「固相ペプチド合成(Solid-phase Peptide Synthesis)」、アドブ.エンザイモロジー(Adv. Enzymology) 32巻, 221頁(1969)参照のこと)。

ポリスチレンベース樹脂は固相ペプチド合成に支持体として非常に一般的に用いられているが、反応物を溶解するために必要な極性有機媒質に比べてこれらが比較的水性であることがペプチド鎖アッセンブリーでは問題である。このような媒質は成長するペプチドを自由に溶解和して、ポリスチレンマトリッ

クスを不完全に溶解させることになる。ポリマー格子中では、試薬拡散低下と立体障害のために結合サイクル中の効率低下、従って繰返しベースでの最終収率の低下が顕著になる。樹脂対ペプチド量比が高く、支持体の物理的性質が支配的であるアッセンブリーの早期段階では、この効率低下が特に急激である。

これらの欠点のために、非常に極性であり、ペプチド合成のために必要な溶媒を自由に透過させる架橋ポリジメチルアクリルアミドベース支持体が開発された。イー.アーサトン(E. Atherton)、ディ.エル.ジュイ.クライブ(D. L. J. Clive)およびアル.シー.シェパード(R. C. Sheppard)による「ポリペプチド合成のポリアミド支持体(Polyamide Supports for Polypeptide)」, 97ジュイ.アメル.ケム.ソク.(97 J. Amer. Chem. Soc.), 6784頁(1975); アル.アルシャディ(R. Arshady), イー.アーサトン(E. Atherton), エム.ジュイ.グイト(M. J. Gait), ケイ.リー(K. Lee)およびアル.シー.シェパード(R. C. Sheppard)による「固相ペプチドおよびオリゴ核酸合成用の製造が容易な極性支持体(Easily Prepared Polar Support For Solid Phase Peptide And Oligonucleotide Synthesis)」, 1977ジュイ.シー.エス.ケム.コム.(1977 J. C. S. Chem. Comm.) 425頁(1979年)参照のこと。アミノメチル誘導体としてのポリアミド樹脂は合成機構に好ましく作用し、支持体にC-末端残基を結合させる適当なリンカー分子の選択を通して保護手段に代り得るものとなる。このようにして合成されたペプチドまたは蛋白質を本明細書を通して「ペプチド」と呼ぶことにするが、これらは多くの研究用途に用いることができ

る。

プロチドの免疫原としての用途が本発明にとって特に重要である。ウイルスコード化蛋白質に含まれる配列と同じ配列の合成ペプチドがこのような蛋白質に関連する生の抗原決定基の同定に有用であることが、今までに実証されている。幾つかの研究機関が種々のHBsAg合成ペプチドの抗原活性に関する研究を報告している。ジー・アール・ドリースマン(G. R. Dreesman)等、ネイチャー(Nature)295巻、158頁(1982);アール・エイ・レルナー(R. A. Lerner)等、プロク・ナトル・アカド・サイ・ユー・エス・エイ.(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.)78巻、3403頁(1981);エイ・エム・プリンス(A. M. Prince)等、プロク・ナトル・アカド・サイ・ユー・エス・エイ.79巻、579頁(1982)参照のこと。このようなペプチドを用いた、HBsAgに対する抗体反応の誘発は比較的弱い。免疫化の前にキャリア蛋白質にペプチドを結合させることによって強化されることが判明している。レルナー等の上記文献;ワイ・サンチェス(Y. Sanchez)等、インターウィロロギイ(Intervirolgy)18巻、209頁(1982)参照のこと。一次配列分析に基づく免疫原蛋白質の可能な抗原決定基の予測は正確ではないので、試行錯誤を通しての推定エピトープの同定は困難である。従って、合成ペプチドの精製およびキャリア蛋白質へのペプチドの結合を必要としないで、生の抗原配列を合成ペプチドによって明らかにする方法は重要な利点を提供する。それ故、本発明の目的は固相合成方法を用いて樹脂上にプロチドを合成し、樹脂からプロチドを分離せずに実験動物に注入して免疫原反応を誘発することのできるポリアミド樹脂の製造方

法を提供することである。前に樹脂からプロチドを分離して精製することを必要としない、固相プロチド合成用のポリアミド樹脂を提供することである。

本発明のさらに他の目的は、結合分析にプロチドを用いる前にプロチドを樹脂から分離して精製する段階を省略した結果として、蛋白質の抗原マッピング形成に特に有用な、固相プロチド合成用ポリアミド樹脂を提供することである。

本発明の上記その他の目的および利点は、以下の説明から当業者に明らかになると思われる。

発明の概要

上記目的は開始剤と促進剤とを用いるフリーラジカル反応において官能基含有分子によってジメチルアクリルアミドモノマーを架橋することから成る。固相プロチド合成用ポリアミド樹脂の製造方法を提供することによって解決される。この場合、ビーズ状ポリアミド樹脂はこれらの試薬の水溶液を水性媒質中に懸濁させた場合に生ずるエマルジョン中で合成される。次に、ビーズを単離して、プロチド合成用の固相として用いる。

ポリアミド樹脂を製造し、前記ポリアミド樹脂上にプロチドを合成し、実験動物を前記ポリアミド樹脂-プロチド複合体によって免疫化することから成る。実験動物に免疫原反応を誘発する方法も提供する。

さらに、ポリアミド樹脂を製造し、前記ポリアミド樹脂上にプロチドを合成してポリアミド樹脂-プロチド複合体を形成し、前記プロチドに特異的に結合しうる抗体を含むと考えられる体液に前記ポリアミド樹脂-プロチド複合体を接触させることか

法を提供することである。

本発明の他の目的は、固相プロチド合成に利用できるポリアミド樹脂および実験動物に注入して免疫原反応を誘発することのできる、ポリアミド樹脂と合成プロチドの複合体を提供することである。

本発明のさらに他の目的は、インビトロ免疫学的分析に用いるためのポリアミド樹脂-プロチド複合体を提供することでもある。

本発明のさらに他の目的は、有機溶媒に加え、洗剤によって乳化した水溶液中でのフリーラジカル共重合によって、官能基含有分子によるジメチルアクリルアミドモノマーの架橋を行う固相プロチド合成用ポリアミド樹脂の製造方法を提供することである。

本発明のさらに他の目的は、ポリアミド樹脂を製造し、前記ポリアミド樹脂上にペプチドまたは蛋白質を合成し、前記ポリアミド樹脂-合成ペプチドまたは合成蛋白質複合体によって実験動物を免疫化することから成る、合成ペプチドまたは合成蛋白質によって実験動物に免疫原反応を誘発する方法に関する。

本発明のさらに他の目的は、本発明のポリアミド樹脂-プロチド複合体を用いて抗原および抗体のような蛋白質を検出する分析方法を提供することである。

本発明のさらに他の目的は、本発明のポリアミド樹脂-プロチド複合体を用いて実験動物に免疫原反応を誘発する方法を提供することである。

本発明のさらに他の目的は、例えば免疫原反応を誘発するた

ら成るインビトロ診断検査方法を提供する。この場合、結合した抗体は例えば酵素結合イムノソルベントアッセイ(Enzyme Linked Immunosorbent Assay)を用いて検出される。

図面の簡単な説明

第1図は酵素結合イムノソルベントアッセイによって得た、ポリアミド樹脂-BTLVⅢペプチド503~522複合体に対するウサギ抗血清の希釈度逆数の関数としての410nmにおける光学密度のグラフである。丸印は複合体によって免疫化されたウサギからのデータを表し、三角印は免疫化する前の同ウサギからのデータを表す。

発明の詳細な説明

上述したように、「プロチド」なる用語は本発明の方法によって合成されるペプチドと蛋白質の両方を意味する。本発明の方法の重要な利点は、ポリアミド樹脂上に合成したペプチドを用いて、ペプチドを樹脂から分離精製することなく、哺乳動物に免疫原反応を誘発することにある。

プロチドをポリスチレンベース樹脂に結合させる通常の方法はベンジルスエステル誘導体による方法であり、プロチドの樹脂からの分離は酸性開裂または塩基性開裂のいずれかによって達成される。ベンジルスエステルは幾つかのこのような開裂方法を受けやすいが、固相合成反応に特徴的な多量脱保護、中和および結合反応を通して安定である。種々のアミノ酸分解反応(エム・マンニング(M. Manning),ジェイ・アム・ケム・ソク.(J. A. Chem. Soc.)90巻、1348頁(1968))およびその他の方法におけるように、ヒドラジンを用いて樹脂からプロチドを分離し

ていた〔ダブリュ・ケッセル(W. Kessler)とビー・イセリン(B. Iselin), ヘルプ・ナム・アクタ(Helv. Chim. Acta.) 49巻, 1930頁(1966)〕。しかし、これらの方法は全てアミノ酸、短いペプチド、樹脂分解生成物、および時には、保護基を不完全に除去したペプチドを含めた合成の副生成物からプロチドを精製することによるプロチドの損傷を避けるために、適当な工程を行うことを必要とする。汚染ペプチドが目的のペプチドと大体同じサイズ、同じ組成である合成において、精製を時には直接の結晶化によって実施することもできるが、さらに特異的な方法を用いなければならない。分離精製の方法に関係なく、このような必要条件是時間のかかる工程を合成に加えることになり、しばしばプロチドの収率を下げることになる。本発明の方法はこのような分離と精製を必要としないので、合成の完成に要する時間は短くなり、プロチドの収率は増大する。

本発明のポリアミド樹脂は水溶液中でジアミノアルカン、好ましくはN,N'-ビス-アルケノイル-ジアミノアルカンのように、分子の各端部にアルケノイル基を有するジアミノアルカンを用いて、市販のジメチルアクリルアミドモノマーを架橋することによって製造する。本発明の好ましい態様では、架橋リンカーはハルベルン(Halpern)とスバロー(Sparrow)の方法〔ジェイ・エイ・ハルベルン(J. A. Halpern)とジェイ・ティ・スバロー(J. T. Sparrow), 「N,N'-ビスアクリルジアミノアルカン合成の改良方法(An Improved Procedure For the Synthesis of N,N'-bisacrylyldiaminoalkanes)」, シンセチックコム(Synthetic Comm.) 10巻, 569頁(1980)〕によって

によって除去される。しかし、MSC基は必要ではない。本発明のポリアミド樹脂は単に過剰なアリルアミンを加え、生成した微粒子を伊別または他の方法によって除去することによっても製造することができる。官能性モノマーの添加量は樹脂1gにつき約0.1mmol〜約0.5mmolの範囲、好ましくは樹脂1gにつき約0.2mmol〜約0.4mmolの範囲の樹脂置換を生ずるように選択する。開始剤は例えば過硫酸塩またはリポフラビンのような当業者に公知の開始剤のいずれかであるが、過硫酸アンモニウムであることが好ましい。

上記物質は水溶液中で一緒にするので、これらの物質を一括して「水相」と呼ぶ。本発明のポリアミド樹脂製造の第2工程は水相と有機相とを一緒にすることである。「有機相」なる用語は、水相と一緒にして攪拌した場合に、本発明の樹脂を得るものとなる懸濁液を生ずるような有機溶媒を意味する。本発明の好ましい実施態様では、有機相はヘキサンと四塩化炭素の混合物である。

均一サイズのビーズを形成するために、攪拌中に乳化剤を加える。乳化剤としては当業者に公知の洗剤が用いられるが、本発明の好ましい実施態様では、ソルビタンセスキオレート、ソルビタンモノラウレートまたはソルビタンデカノエートのいずれかが用いられる。洗剤添加量は大体均一サイズの球状の樹脂が得られるように調節する。洗剤量が低下すると、粗粒の非品質物質の量が増加したエマルジョンが生じ、アミノ酸の内部成長の遅延に寄与する。洗剤量が増大すると微粒状物質量が増加し、このような微粒状物質をかなりの量の樹脂の損失なしに

製造したN,N'-ビスアクリル-1,3-ジアミノプロパンまたはN,N'-ビスアクリル-1,3-ジアミノブタンのものであり、前記方法はこの特定の参照のために全体的にここに関係する。プロパン同族体の使用はエチレン同族体の使用によって得られるポリマーよりも孔径が大きく、プロチド合成中に改良された溶解性を示すポリマーを形成するので好ましい。しかし、この文献に記載された他のジアミノアルカン、すなわちN,N'-ビスアクリル-1,2-ジアミノエタンとN,N'-ビスアクリル-1,6-ジアミノヘキサンならびにその他のジアミノアルカン類も本発明の樹脂の製造に用いるために適している。

本発明の架橋樹脂には、官能性モノマーが含まれる。「官能性モノマー」なる用語は合成ペプチドのC-末端アミノ酸を樹脂に固定するために用いられるようなアルケニルアミンを意味する。官能性モノマーはメチルスルホニルエチルオキシカルボニル(MSC)基で保護した場合には〔ジー・アイ・テッセル(G. I. Tessel)とアイ・シー・バルベルト-ギアース(I. C. Balvert-Geers), 「メチルスルホニルエチルオキシカルボニル基、広い用途を有する新しいアミノ保護機能(The Methylsulfonylethylloxycarbonyl Group, A New And Versatile Amino Protective Function)」, イント・ジェイ・ペプチド・プロテインレス(Int. J. Peptide Protein Res.) 7巻, 295頁(1975)〕、MSCアルケニルアミンと呼ばれる。このような官能性モノマーは市販の塩化物誘導体とアルケニルアミンとの反応によって製造され、次いでMSC保護基が塩基に

除去することは不可能である。このような微粒状物質はペプチド合成時の反応器ならびに反応器に関連するラインおよび弁を詰めることになる。

次に、促進剤を加えて、懸濁液中のモノマーの重合を促進させ、本発明のポリアミド樹脂のビーズを形成する。多くの促進剤が当業者に公知であるが、本発明のポリアミド樹脂の製造にN,N,N',N'-テトラメチルエチレンジアミン(TEMED)を用いると特に有望な結果が得られる。次に、生成したビーズを伊別し、洗浄し、MSC基(存在する場合に)を塩基によって除去し、ビーズを乾燥させる。次に、ビーズをメッシュ・シーブに通して、比較的均一なサイズであるようにする。本発明の方法を用いた収率は出発モノマーを基準にして約87%〜約94%の範囲である。

本発明のアミノメチル、架橋ポリジメチルアクリルアミド樹脂はプロチドを水溶液中で最大に露出させ、樹脂ポリマーの基幹はプロチドを構造的に制限しない。ポリアミド樹脂は水によって高度に溶媒和されるとその乾燥固体積の数値にも影響するので、その結果プロチドが露出される。

次に、樹脂に付着するリンカーに活性化剤を結合させることによって、ビーズ上にプロチドが合成される。「リンカー」なる用語はプロチドの第1アミノ酸のカルボキシル基をポリマー樹脂に結合させる結合基を意味する。本発明の好ましい実施態様では、このリンカーがオキシアルキル安息香酸(OBA)であり、これにアミノ酸残基が結合して、プロチド鎖の第1アミノ酸として役立つOBAリンカーを用いてC-末端アミノ酸を本発

明のポリアミド樹脂に付着させるので、無水フッ化水素を用いて、樹脂からプロチドをあまり失うことなく、プロチドから側鎖の保護基を除去することができる。下記の実施例では、選択するアミノ酸はグリシンであり、これを t -ブチルオキシカルボニル(t -Boc)保護基によって保護するが、アミノ酸が如何なるアミノ酸でもよいこと、特に合成すべきプロチドの第1アミノ酸になるアミノ酸であること、および他の保護基も同様に適していることは、本発明の開示の恩恵を受ける当業者によって理解されるであろう。グリシン残基はプロチドと樹脂ポリマー基幹との間のスペーサーという付加的機能を有する。

本発明の好ましいリンカーであるBoc-グリシル-4-(オキシメチル)安息香酸はミッチェル等が述べている方法の改良によって製造した(エイ.アール.ミッチェル(A. R. Mitchell), エス.ビー.エッチ.ケント(S. B. H. Kent), エム.エンゲルハート(M. Engelhardt)およびアール.ビー.メリーフィールド(R. B. Merrifield)の t -ブチルオキシカルボニルアミノアシル-4-(オキシメチル)フェニルアセトアミドメチル樹脂の新規な合成ルート、固相ペプチド合成の改良支持体(A new synthetic route to *tert*-butyloxy carbonylaminoacyl-4-(oxymethyl) phenylacetamido-methyl-resin, an improved support of solid phase peptide synthesis)「ジェイ.オルグ.ケム.(J. Org. Chem.)」43巻, 2845頁(1978)、これはこの特定の参照によってここに全体的に関係する)、ミッチェル等の方法の重要な改良点は、溶媒としてのジメチルホルムアミドの使用を除いたことである。この溶媒は蒸発し難いため、温度を上げて蒸発を促

進させたとしても、合成法がまだ時間のかかるものである。上述のように製造したポリアミド樹脂にリンカーを結合させるために用いる活性化剤はジイソプロピルカルボジイミドと4-ジメチルアミノピリジンであるが、ジシクロヘキシルカルボジイミドおよび4-メチルピロールインジノピリジンのような他の活性化剤も同様にこのような目的に適していることは当業者に理解されるであろう。

ポリアミド樹脂上にプロチドを合成した後に、実験動物に免疫反応を誘発するインビトロ免疫検定法または抗原決定基のマッピング形成を含めた多くの用途にポリアミド樹脂-プロチド複合体を用いることができる。例えば、インビトロ検定法はビーズ状ポリアミド樹脂-プロチド複合体を乳鉢と乳棒で粉砕して、粉砕した複合体をマイクロタイターテストプレートのような固相に中性pHの緩衝液によって吸収させることによって実施する。樹脂上の蛋白質またはペプチドを特異的に結合しうる抗体を含むと考えられる血清またはその他の体液を吸収複合体とともにインキュベートし、結合しない抗体を洗浄によって除去し、結合した抗体を酵素結合イミノソルベントアッセイ、ビオチン-アビジン増強アッセイまたはその他の技術上周知の検出方法によって検出する。

プロチド合成中に間隔をおいてポリアミド樹脂-プロチド複合体の一部を単に除去し、プロチドを脱保護し、除去した各部分を連続的にテストして、プロチドが抗体を結合する点を合成中に確認することによって、ポリアミド樹脂-プロチド複合体を用いて抗原決定基のマッピングを形成することもできる。この方

実施例 I

官能性モノマーの製造

2-メチルスルホニルエチルオキシカルボニルクロリド(MSCクロリド)(K+K Labs, I CN) 5g (26.8mmol) をアセトニトリル15ml中に溶解し、再蒸留アリルアミン[コダック(Kodak)] 2.1g (28mmol) と再蒸留ジイソプロピルエチルアミン(DIEA) 4.9g (28mmol) とをアセトニトリル20ml中に溶かした溶液に攪拌しながら、20分間にわたって滴加した。この溶液をさらに2時間攪拌し、溶媒を蒸発させた。残渣を酢酸エチル250ml中に加え、1~2時間放置した。多重のDIEA塩酸塩が針状結晶として沈澱した。分別し蒸発した後に、粗生成物を少量のクロロホルム中に溶解し、同溶媒に充填したシリカゲルG-60カラム(60g)上に負荷した。クロロホルムによる溶離によって、純粋なMSC-アリルアミンが得られた。[TLCでの $R_f = 0.64$ (溶媒=CHCl₃:CH₃OH, 9:1)]

残りのDIEA塩はこれらの条件下でカラムに吸着した。時にはTLC上を溶媒に近似して前進する物質がMSCアリルアミンカラム分画を汚染した。この物質は塩化メチレン-ヘキサンからMSCアリルアミンを-20℃において再結晶することによって除去した。収量は48gであった(MSCクロリドから86%)。

実施例 II

架橋リンカーの製造

ヘルペルン(Helpern)とスパロー(Sparrow)の上記文献に記載の方法によって、架橋リンカーN,N'-ビスアクリリル-1,3-ジアミノプロパンを製造した。簡単に説明すると、ジ

法は他の合成方法で必要な分離精製工程を省略して実施することができる。この複合体は粉砕して、マイクロタイターテストプレートのような固体支持体に吸収させることによって、その抗体結合力に関してテストし、上述のように検定することができる。このような検定法のために樹脂からプロチドの分離およびプロチドの精製は必要ではない。

ポリアミド樹脂-プロチド複合体は免疫原としても有用である。アジュバントを用いてまたは用いずに、この複合体によって実験動物を直接免疫化することができる。ここで用いる「実験動物」なる用語は、免疫反応を起しうる動物を意味する。主な対象動物は哺乳動物であるが、本発明の方法を用いて鳥のような、他の実験動物に免疫原反応を誘発することもできる。例えば、完全フロイントアジュバント中でエマルジョン化した、B型肝炎抗原(HBsAg)ペプチド119-159と同じ配列を有する合成ペプチドを含む複合体を用いるウサギの免疫化によって、ラジオイムノアッセイによる測定でB型肝炎に特異的な免疫反応が誘発された。ラジオイムノ沈澱法によって測定して同じような結果がエイズウイルスHTLV-IIIの蛋白質被膜に相当するペプチドと本発明のポリアミド樹脂とから成る複合体によって得られた。

次の実施例を参照することによって、本発明をさらに良く理解することができるが、これらの実施例は説明のためのものであって、本発明を限定するものではない。

アミノプロパン (アルドリッチ (Aldrich)) をアセトニトリル中に溶解し、塩化アクリル-アセトニトリル溶液に4℃において滴加し、室温にまで温度上昇させ、攪拌した。二塩酸ジアミノプロパンを分別し、熱アセトニトリルによって洗浄し、一緒にした母液を真空濃縮した。N,N'-ビスアクリル-1,3-ジアミノプロパンを4℃において一晩析出させ、生成した板状結晶を分別し、真空乾燥した。

実施例Ⅲ

ポリアミド樹脂の製造

窒素供給管と機械駆動ガラススターラーとを備えた、2ℓ-ガラス製シリンダー状みそ付き重合器に、ヘキサン490ℓおよび四塩化炭素290ℓを加えた。この溶液に窒素を15分間バージして、酸素を除去した。この溶液に、実施例Ⅱで述べたように製造したN,N'-ビスアクリル-1,3-ジアミノプロパン(2.9g, 15.9mmol)をN,N'-ジメチルアクリルアミド〔ポリサイエンス (Polysciences)〕18.2ℓ(175mmol)と混合して含む溶液を加えた。次に、実施例Ⅰに述べたように製造したMSCアリルアミン10g(48mmol)と水120ℓとを加え、溶液を濾過し、有機相に加える前に脱気した。生成した混合物の密度を調整し、400~450RPMで攪拌して均一な懸濁液を得た。過硫酸アンモニウム〔バイオラッド (Bio Rad)〕(H_2O 5ℓ中0.5g)と、ソルビタンセスキオレートまたはソルビタンモノラウレート〔シグマ (Sigma)〕1ℓとを加えた。次に、 H_2O 2ℓ中N,N,N',N'-テトラメチルエチレンジアミン (TEMED) (バイオラッド) 3ℓの溶液、pH 6.5~7.5 (濃HCl)をこの懸濁液に加えた。

実施例Ⅳ

リンカーの製造

ミッチェル等の上記文献の方法の改良法によって、リンカーのBoc-グリシル-4-(オキシメチル)安息香酸を製造した。簡単に説明すると、酢酸エチル450ℓ中に再蒸留ジイソプロピルエチルアミン10.3ℓとプロモアセトフェノン12.05g(60.6mmol)とを溶解することによって、4-(プロモメチル)安息香酸フェニルアシルエステルを製造した。この攪拌した溶液に40~50℃において、4-(プロモメチル)安息香酸(13.89g, 60.6mmol)を7等分して3時間にわたって加えた。攪拌を室温においてさらに2時間続けた。沈澱した Et_3NHBr を分別し、酢酸エチル溶液を10%クエン酸水溶液、飽和塩化ナトリウム、飽和重炭酸ナトリウムおよび飽和塩化ナトリウムの各50ℓによって4回洗浄した。有機相を無水硫酸マグネシウム上で乾燥させ、減圧下での回転蒸発によって溶媒を除去した。残渣を CH_2Cl_2 -石油エーテル(1:3 v/v)から再結晶して、4-(プロモメチル)安息香酸フェニルアシルエステルを得た。

4-(プロモメチル)安息香酸フェニルアシルエステルをBoc-グリシル-4-(オキシメチル)安息香酸に転化するために、Boc-レグリシン(25mmol, 4.38g)をエタノール15ℓに溶解し、水酸化テトラメチルアンモニウム(メタノール中25%)で中性になるまで滴定した。溶媒を真空下でのクロロホルムとの共沸蒸留によって除去し、塩をアセトニトリル150ℓ中に溶解した。攪拌した溶液に、上述のように製造した4-(プロモメチル)安息香酸フェニルアシルエステル5.8g(17.5mmol)を加えた。一晩混合

懸濁エマルジョンを窒素雰囲気下で2時間攪拌した。生成したビーズ状物質を濾過し、水(1ℓ)、メタノール(1ℓ)、ジオキサン:メタノール:2NNaOH(14:5:1, 2ℓ, MSC基を除去するため)、水(2ℓ)、1NHCl(2ℓ)、水(2ℓ)および次にメタノール(2ℓ)によって連続的に洗浄した。樹脂をメタノール中に懸濁し、デカントすることによって(3×)洗浄した。塩化メチレン(ベーカー (Baker), HPLC等級)中で脱脂させた後に、樹脂をヘキサン中で取縮させ、真空乾燥した。この樹脂を80メッシュ(180ミクロン)シーブに通すことによって、大きい非品質物質を除去した。

活性剤としてジイソプロピルカルボジイミド、触媒として4-ジメチルアミノピリジン(酢酸エチルから再結晶したもの)を用いて、樹脂100gにBocアラニンに結合させることによって、官能化度をチェックした。アミノ酸分析はロットに依存して0.15~0.35mmol/樹脂gの置換が生じたことを示し、アリルアミン添加量に依存して、約0.1mmol/樹脂g程度から約0.5mmol/樹脂g程度までの置換を生じた樹脂が製造された。負荷した樹脂はピクリルスルホン酸によって検知可能な着色を示さず、このことは未反応の遊離アミンが存在しないことを示している。樹脂ビーズは塩化メチレン中で脱脂した場合に、その乾燥床体積の約2.5倍となった。ジメチルホルムアミドまたは水溶液中で脱脂させると、ビーズはその乾燥床体積のそれぞれ、約4倍と6倍になった。

した後に、沈澱したテトラメチルアンモニウムブロミドを分別し、溶媒を蒸発させた。残渣を酢酸エチル400ℓ中に溶解し、溶液を濾過した。次に、有機相を10%クエン酸水溶液(3×75ℓ)、0.5M重炭酸ナトリウム:0.5M炭酸カリウム(2:1) pH 9.5(8×75ℓ)、次に水(3×75ℓ)によって連続的に洗浄した。溶液を乾燥させ($MgSO_4$)、溶媒を真空除去した。残渣を85%酢酸200ℓに溶解し、これに酸洗した亜鉛ダスト23gを加えた。TLCによってフェニルアシルエステルがもはや検出されなくなるまで、混合物を攪拌した(4~5時間)。亜鉛を分別し、酢酸50ℓで洗浄し、一緒にした溶液を真空乾燥した。残渣を水100ℓ:酢酸エチル300ℓ中に溶解し、pHを1.5に調整した(conc HCl)。水相を第2の酢酸エチル量(200ℓ)で抽出し、一緒にした抽出物を水(100ℓ)で洗浄した。乾燥($MgSO_4$)と蒸発の後で、-10℃における塩化メチレン:ヘキサンからの再結晶によって精製した。収量は4.5g(14.5mmol、フェニルアシルエステルからの収率83%)であった。

実施例Ⅴ

ポリアミド樹脂へのリンカーの結合

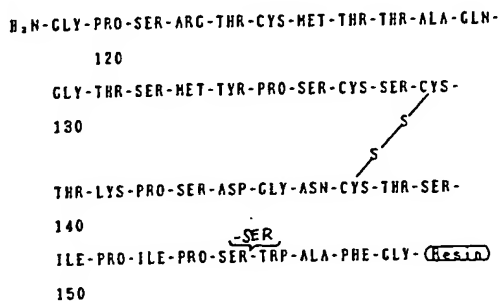
バイオサーチ サムⅡ (Biosearch Sam II) 自動ペプチド合成器において塩化メチレン:ジメチルホルムアミド(1:1)溶液中で活性剤としてジイソプロピルカルボジイミドとジメチルアミノピリジンを用いて、実施例Ⅳで述べたように製造したBoc-グリシル-4-(オキシメチル)安息香酸を実施例Ⅲに述べたように製造したアミノメチルポリアミド樹脂(1.2g)に結合させた。塩化メチレン(ベーカー HPLC等級)とジメチルホルムア

ミド〔ベーカーフォトレックス(Baker Photrex)等級〕の両方は再精製せずに用いた。フッ化水素による処理後に、グリシル樹脂50gが0.13mmol/gを含有することがアミノ酸分析によって判明した。アミノ酸分析はベックマンモデル119(Beckman Model 119)アミノ酸分析器を用いて、樹脂結合ペプチドの2時間加水分解(12N HCl:プロピオン酸1:1, 135℃)または24時間加水分解(6N HCl, 110℃)によって実施した。

実施例V

B型肝炎抗原ペプチドの合成

バイオサーチ社Ⅱ自動ペプチド合成器を用いて、実施例Ⅳに述べたように製造したBoc-グリシル-4-(オキシメチル)安息香酸リンカーが付着したアミノメチル架橋ポリジメチルアクリルアミド樹脂に、B型肝炎表面抗原(HBsAg)ペプチド119~159を結合させた(全ての残基は2重に結合した)。HBsAgペプチドの配列は次の通りであり、AYWサブタイプに相当する:



Fを蒸発させた後、ペプチジル樹脂をエーテル、1%酢酸、メタノール、塩化メチレン中5%DIEA、メタノール、最後に1%酢酸によって連続的に洗浄した。ペプチジル樹脂を真空乾燥させた。0℃でのエタノールアミンによる処理によってトリプトファンからホルミル基を除去した。フェリシアン化カリウム処理によってシステイン139と147の間にジスルフィド橋が形成された。システイン124と137の間の第2ジスルフィド橋は酢酸中ヨウ素の溶液によってアセトイミドメチル基を同時に除去する間に生成した。

実施例VI

HBsAg抗体の存在のインビトロ検定法

次のインビトロ検定法によって、HBsAgペプチド119-159に特異的な抗体の存在に関して、ヒト血清を分析した。実施例Ⅳに述べたように製造したHBsAgペプチド119-159-ポリアミド樹脂若干量を乳鉢と乳棒によって粉砕した。顕微鏡を用いて、ポリアミド樹脂-ペプチド複合体が粉砕されたことを実証する。例えばリン酸緩衝剤添加食塩水(PBS)のような中性pH緩衝液中に粉砕ポリアミド樹脂-ペプチド複合体約200ng〜約10μgを含む溶液約100μlをダイナテックイムノロンⅡ(Dynatech ImmunolonⅡ)マイクロフィルターテストプレートのような固相に吸着させる。非特異的結合部位を10%正常ヤギ血清(NGIS)によってブロックし、プレートをトウィーン20(Tween20)PBS(T-PBS)によって洗浄して未結合抗体を除去した。

HBsAgペプチド119-159に特異的な抗体を含有すると考え

このペプチドはジスルフィド橋の特異的形成を制御するために次の置換:システイン121,138,149の代りにセリンを含むものであった。システイン139と147スルフィドリルは4-メトキシベンジル基によってブロックされ、124と137のシステインのスルフィドリルはS-アセトアミドメチル誘導体として保護された。α-N-(t-Boc保護アミノ酸はバケム(Bachem)から購入した。付加的な側鎖保護基は次の通りであった:トリプトファンのインドール環素に対するホルミル基;スレオニンとセリンのヒドロキシルに対するベンジルエーテル;上記のシステインスルフィドリルに対するアセトアミドメチルまたは4-メトキシベンジル;アスパルチン酸のβ-カルボキシルとグルタミン酸のγ-カルボキシルに対するベンジルエステル;リシンのε-アミノ基に対する2-クロロベンジルオキシカルボニル;チロシンのフェノール系ヒドロキシルに対する2,6-ジクロロベンジルエーテル;およびアルギニンのグアニジンに対するp-トリル基。合成には、塩化メチレン(ベーカーHPLC等級)とDMF(ベーカーフォトレックス等級)を再精製せずに用いた。ジソプロピルエチルアミン(DIEA)(アルドリッチ)はニンヒドリン上で還元させて再蒸留した。トリフルオロ酢酸〔ハロカーボン(Halocarbon)〕は再蒸留して、中間留分を脱ブロック工程に用いた。他の全ての化学薬品は試薬等級以上であり、再精製せずに用いた。

完成ペプチジル樹脂をアニソール10%とエタノール2%とを含む無水HF(20ml/樹脂g)によって0℃において30分間処理することによって、これから側鎖保護基を除去した。H

られるヒト血清と、10%NGISで希釈したポリアミド樹脂-HBsAgペプチド119-159でウサギを免疫化することによって製造したウサギ抗血清をポリアミド樹脂-ペプチド複合体プレートに加え、37℃において1時間インキュベートし、次にT-PBSで洗浄した。次に、ビオチンヤギ抗ヒトIgGまたはビオチンヤギ抗ウサギIgG〔ベクターラボラトリーズ(Vector Laboratories), カリフォルニア州, バーリングガム〕をそれぞれ、結合したヒトおよびウサギ血清とともに、37℃において1時間インキュベートする。孔を洗浄し、セイヨウワサビペルオキシダーゼに結合したアビジン(Av-HRP)を室温において20分間加える。次に、孔をT-PBSで洗浄して、未結合Av-HRPを除去し、1,2'-アジノージ(3-エチル-ベンズチアゾリンスルホン酸〔シグマケミカル社(Sigma Chemical Co.)〕の1M溶液と基質としての0.03%H₂O₂を用いてペルオキシダーゼ活性を測定する。水中5%(v/v)ドデシル硫酸ナトリウムを用いて反応を停止した後、ダイナテックプレート読取り機を用いて410nmにおいて分光測光的に定量する。滴定によって各試薬の最適希釈度を測定する。基質以外の特異的結合測定用試薬は全て、10%NGIS中で希釈する。

実施例VII

HBsAg抗体の存在のインビトロ検定法

次のインビトロ検定法によってB型肝炎表面抗原に対する抗体の存在に関して、ヒト血清を分析した。ポリアミド樹脂-HBsAgペプチド119-159複合体の10%溶液を、テトラヒドロフラン40%の最終濃度を含む緩衝化ウシ血清アルブミン(BSA)

溶液中に製造した。1¹¹¹100,000~1,000,000counts/分を含む、HBsAgペプチド119-159に特異的な抗体の等量を加え、おだやかに揺らしながらインキュベートした。生成した懸濁液を遠心分離し、ペレットを1%BSA-オートウィーン20PBSによって洗浄してから、再び遠心分離した。次にガンマーカウンター内でペレットの放射能を計測した。結果は生のHBsAg抗体によるポリアミド樹脂HBsAgペプチド119-159複合体の識別を明確に示している:

	グリシル樹脂 (対 照)	樹脂-HBsAgペプチド 119-159複合体
1gGヒト抗HB 1	1240cps	22,840
1gGヒト抗HB 2	1921	28,732
正常ヒト1gG	1432	1949

測定値は全て counts/分

実施例Ⅱ

哺乳動物における免疫原反応誘発へのポリアミド樹脂

ニプロチド複合体の使用

実施例Ⅱに述べたように製造したポリアミド樹脂-ペプチド複合体を用いて、ウサギに下記のように免疫原反応を誘発した。ニュージーランド産白ウサギ(雄)を、完全フロイントアジュバント中にエマルジョン化したHBsAgペプチド119-159 200μg(ペプチド-樹脂複合体として)またはグリシル樹脂のみ(免疫原の範囲、ウサギに対して50μg~1mg)のいずれかの月1回筋肉内注射3回によって免疫化した。

2週間毎の採血後に血清を回収し、市販のラジオイムノアッ

セイ(RIA)キット(AUSAB,アボットラボラトリーズ(Abbott Laboratories))を用いて抗-HBsAg活性を調べた。ウサギに誘発された抗ペプチド119-159抗体反応による生のHBsAg表面抗原の識別は、RIAによって得られた次のデータによって実証される:

ウサギ	免疫原	免疫化	抗体力価 ^a (RIA単位/ml)
No.1	グリシン-樹脂	免疫前 ^a	≤8
		第1回	≤8
		第2回	≤8
		第3回	≤8
No.2	HBsAgペプチド/樹脂	免疫前	≤8
		第1回	≤8
		第2回	183
		第3回	920
No.3	HBsAgペプチド/樹脂	免疫前	≤8
		第1回	≤8
		第2回	72
		第3回	262

a. 免疫化前に得た血清

b. HBsAgに対する抗体力価はRIAキットの感度以下であり、特異的抗体を含まないと考えられる。

このデータから分るように、システイン139と147の間に単独のジスルフィド橋を含むポリアミド樹脂-HBsAgペプチド

119-159複合体は、ウサギの免疫化に用いた場合に、HBsAgと交差反応する抗ペプチド抗血清を生じた。

実施例Ⅲ



H-T-L-V-Ⅲ抗原ペプチドの合成

実施例Ⅲに述べたように製造したBoc-グリシル-4-(オキシメチル)安息香酸リンカーを実施例Ⅴに述べた方法によって付着させた。実施例Ⅲで述べたように製造した架橋ポリメチルアクリルアミド樹脂に、H-T-L-V-Ⅲペプチドgp120 503~532を実施例ⅥでHBsAgペプチド119-159合成に関して述べた方法と同じ方法で結合させた。唯一の相違点は保護アミノ酸を加えた順序である。H-T-L-V-Ⅲペプチドgp120 503~532の配列は次の通りである。

gp120 503~532

H₂N-VAL-ALA-PRO-THR-LYS-ALA-LYS-ARG-ARG-
503

VAL-VAL-GLN-ARG-GLU-LYS-ARG-ALA-VAL-GLY-
ILE-GLY-ALA-LEU-PHE-LEU-GLY-PHE-LEU-

GLY-ALA-GLY--CH₂--CH₂-(RESIN)
532

実施例Ⅳ

免疫原反応誘発へのポリアミド樹脂-H-T-L-V-Ⅲ合成複合体の使用

ポリアミド樹脂-H-T-L-V-Ⅲペプチド503~532複合体で免疫化したウサギは、実施例Ⅶの方法に従って実施した酵素結合

イムノソルベントアッセイによって測定すると特異的な抗ペプチド反応を示した(実施例Ⅶで用いたHBsAgペプチド119-159ではなく、ポリアミド樹脂-H-T-L-V-Ⅲペプチド503~532複合体によってウサギを免疫化して得た抗血清を用いた)。このイムノアッセイの結果は第1図にグラフ化して示す。丸印によって表すデータは複合体によって免疫化したウサギからのデータであり、三角印によって表すデータは免疫化する前の同じウサギからのデータである(実丸と実三角は両方とも1匹のウサギからのものであり、空丸と空三角は両方とも1匹のウサギからのものであり、他の空丸と空三角は両方とも第2のウサギからのものである)。ポリアミド樹脂と第3ペプチドとからの複合体は有意な結合を示すことができなかった。ウサギの1匹は、ジェイ・ビー・アラン(J.B.Allan)等のサイエンス(Science)228号,1091頁(1985)およびエフ・バリン(F.Barin)等のサイエンス228号,1094頁(1985)の方法に従って実施したラジオイムノ沈降アッセイに基づく、H-T-L-V-Ⅲのgp-120被覆蛋白質に対して特異的な抗H-T-L-V-Ⅲ反応を生じた。前記両文獻はこの特定の参照によって全体的にここに関係する。

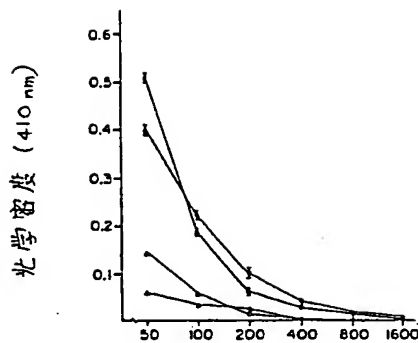
ペプチド503~532に対して生じたウサギ抗血清がH-T-L-V-Ⅲ感染性を中和することは、一定量の抗血清によるH-T-L-V-Ⅲストックの10倍希釈を用いて、逆転写酵素活性の低下に基づいて評価した。エフ・バレー・シノッシ(F.Barre-Sinoussi)等のサイエンス220号,868頁(1983)参照のこと。単独ウサギ抗ペプチド503~532抗血清はウイルスの10倍希釈時に、エイズ患者からプールしたヒト血清に比べて、10回目にH-T-L-V-Ⅲ複

製を効果的に減少させた。第2のウサギのこのペプチドに対する抗血清はH T L V - III複製を減少させることができなかった。R T アッセイを通して対照として用いた。ウサギが同じ免疫原を受容して検出可能な抗ペプチド反応を生じたにも拘わらず、ラジオイムノ沈降アッセイに基づくと抗H T L V - III活性はこの特定の血清中に検出されなかった。

H T L V - IIIを中和する抗血清はsp120とsp160の両方の被覆糖蛋白質を検出する。このウサギ抗血清はH T L V - III感染後12日目と15日目に、ヒトエイズ血清に比べてH T L V - IIIの中和に効果的でないことが判明した。

上記実施例は本発明の方法を例示するために述べたものである。これらの方法の変更態様は当業者が理解するものであり、このような変更態様の全てが次の請求の範囲に述べる本発明の精神および範囲から逸脱することなく実施されたと考えられる。

第1図



抗血清の希釈度逆数

補正書の翻訳文提出書
(特許法第184条の7第1項)

昭和62年12月28日

特許庁長官 小川 邦 夫 殿

1. 特許出願の表示

PCT/US87/00971

2. 発明の名称

ポリアミド樹脂及び免疫診断用試薬の調整法

3. 特許出願人

住 所 アメリカ合衆国テキサス州78284, サン・アントニオ,
ビー・オー・ボックス 28147
名 称 サウスウェスト・ファウンデーション・フォー・
バイオメディカル・リサーチ (外1名)

4. 代理人

住 所 東京都千代田区大手町二丁目2番1号
新大手町ビル 206号室
電 話 (270) 6641-6646
氏 名 (270) 弁護士 湯 浅 恭 三

5. 補正書の提出日

昭和62年 9月15日

6. 添付書類の目録

(1) 補正書の翻訳文 1通

請求の範囲 (19条補正)

(1) 水溶液中でジメチルアクリルアミドモノマーと官能性モノマーとを共重合することによって、ジメチルアクリルアミドモノマーを架橋し;

有機溶媒中で前記水溶液を^乳化し;および

開始剤と促進剤とを加えることによって生成したポリアミド樹脂ビーズを単離する工程;

を含む固相^{支持体}合成用ポリアミド樹脂の製造方法。

(2) ジメチルアクリルアミドモノマーをジアミノアルカンによって架橋する請求の範囲第1項記載の方法。

(3) ジアミノアルカンがN,N'-ビスアルケノイル-ジアミノアルカンである請求の範囲第2項記載の方法。

(4) ジアミノアルカンを、N,N'-ビスアクリリル-1,3-ジアミノプロパン;N,N'-ビスアクリリル-1,3-ジアミノエタン;N,N'-ビスアクリリル-1,3-ジアミノブタンおよびN,N'-ビスアクリリル-1,3-ジアミノヘキサンからなる群から選択する請求の範囲第3項記載の方法。

(5) 官能性モノマーがアルケニルアミンである請求の範囲第1項記載の方法。

(6) アルケニルアミンがさらに保護基を含む請求の範囲第5項記載の方法。

(17) リンカーがBoc-グリシル-4-(オキシメチル)安息香酸である請求の範囲第15項記載の方法。

(18) 請求の範囲第1項記載の方法に従って製造したポリアミド樹脂。



- (19) 塩化メチレン中で均質すると、その乾燥床体積の約2.5倍になり；
約8%～約12%が架橋し；
樹脂1gにつきアリルアミン約50～約400μmolを含有し；
アミド結合によって樹脂に結合した時に、樹脂1gにつきアミノ酸約0.1～約0.5μmolと置換しうる；および
負荷した時に、未反応遊離アミンを有しないこと；
を特徴として含むポリアミド樹脂。
- (20) ビーズの直径が約180μ未満であることをさらに特徴とする請求の範囲第19項記載のポリアミド樹脂。
- (21) ポリアミド樹脂を製造し；
ポリアミド樹脂上に~~アミド~~^{アミド}を合成し；および
哺乳動物をポリアミド樹脂-~~アミド~~^{アミド}複合体によって免疫化する段階；
から成る哺乳動物に免疫原反応を誘発する方法。
- (22) ポリアミド樹脂が架橋ポリジメチルアクリルアミド樹脂である請求の範囲第21項記載の方法。
- (23) ポリアミド樹脂にリンカーを介して蛋白を結合させることによって、ポリアミド樹脂上に蛋白を合成する請求の範囲第21項記載の方法。
- (24) リンカーがオキシアルキル安息香酸誘導体である請求の範囲第23項記載の方法。
- (25) リンカーがBoc-グリシル-4-(オキシメチル)安息香酸である請求の範囲第23項記載の方法。
- (26) 哺乳動物をアジュバンド中のポリアミド樹脂-~~アミド~~^{アミド}

- と
半複合体によって、免疫化する請求の範囲第21項記載の方法。
- (27) ポリアミド樹脂を製造し；
蛋白をポリアミド樹脂上に合成して、ポリアミド樹脂-蛋白複合体を形成する；
蛋白と特異的に結合しうる抗体を含むと思われる体液にポリアミド樹脂-蛋白複合体を接触させる；および
結合した抗体を検出する段階；
から成るインビトロ診断検定方法。
- (28) ポリアミド樹脂-蛋白複合体を血清との接触前に固相に吸着させる請求の範囲第28項記載の方法。
- (29) ポリアミド樹脂製造工程が次の段階：
水溶液中でジメチルアクリルアミドモノマーと官能性モノマーとを共重合することによって、ジメチルアクリルアミドモノマーを架橋し；
有機溶媒中で前記水溶液を乳化し；および
開始剤と促進剤とを加えることによって生成したポリアミド樹脂ビーズを単離する段階；
を含む請求の範囲第27項記載の方法。

国際調査報告

International Application No. PCT/US87/00971

1. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (Inventor's classification, if any, should also be given.)		
IPC(4): C08F 20/56; C08G 67/00; A61K 39/00; G01N 33/545; G01N 53/00 U.S. CL: 526/303.1; 526/332; 424/88; 436/531; 435/7		
2. FIELD OF SEARCH		
Classification System	Classification System	
U.S.	526/303.1, 326; 525/379, 382; 528/332, 392; 530/334, 335 336, 337, 403, 405; 424/88, 89, 92; 435/7; 436/531, 543	
Do you request searches under other Classification Systems? If so, specify them and indicate in which of the above Systems they are included.		
CAS ONLINE, APS DATA BASES: 1967 to present		
3. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Character of Document, if not indicated, when appropriate, of the relevant document	Relevant to Claim No. 1*
Y	SU.B. 1,007,676, 30 March 1983, See the Abstract.	21-26
Y	US.A. 3,917,582, (SOFFER ET AL.) 04 November 1975, See column 6, lines 16-35 and the Abstract.	21-29
A	US.A. 4,026,879, (SPECTOR) 31 May 1977, See column 2, lines 28-55.	21-30
Y	US.A. 4,235,867 (THOMA) 25 November 1980, See the Abstract and Example 1.	1,9,13, 27-29
Y	Journal of the American Chemical Society, Vol. 97, No. 22, issued 29 October 1975, Atherton et al., "Polyside Supports for Polypeptide Synthesis", pages 6584-6585, see the second full paragraph of the left-hand column of page 6594.	1-20, 30
* Source categories of cited documents:		
"A" document defining the subject matter of the invention to be claimed in the international application.		
"B" document defining the subject matter of the invention to be claimed in the international application.		
"C" document defining the subject matter of the invention to be claimed in the international application.		
"D" document defining the subject matter of the invention to be claimed in the international application.		
"E" document defining the subject matter of the invention to be claimed in the international application.		
"F" document defining the subject matter of the invention to be claimed in the international application.		
"G" document defining the subject matter of the invention to be claimed in the international application.		
"H" document defining the subject matter of the invention to be claimed in the international application.		
"I" document defining the subject matter of the invention to be claimed in the international application.		
"J" document defining the subject matter of the invention to be claimed in the international application.		
"K" document defining the subject matter of the invention to be claimed in the international application.		
"L" document defining the subject matter of the invention to be claimed in the international application.		
"M" document defining the subject matter of the invention to be claimed in the international application.		
"N" document defining the subject matter of the invention to be claimed in the international application.		
"O" document defining the subject matter of the invention to be claimed in the international application.		
"P" document defining the subject matter of the invention to be claimed in the international application.		
"Q" document defining the subject matter of the invention to be claimed in the international application.		
"R" document defining the subject matter of the invention to be claimed in the international application.		
"S" document defining the subject matter of the invention to be claimed in the international application.		
"T" document defining the subject matter of the invention to be claimed in the international application.		
"U" document defining the subject matter of the invention to be claimed in the international application.		
"V" document defining the subject matter of the invention to be claimed in the international application.		
"W" document defining the subject matter of the invention to be claimed in the international application.		
"X" document defining the subject matter of the invention to be claimed in the international application.		
"Y" document defining the subject matter of the invention to be claimed in the international application.		
"Z" document defining the subject matter of the invention to be claimed in the international application.		
4. EPIGRAPH		
Date of the first publication of the international application	Date of filing of the international application	
14 July 1987	27 JUL 1987	
International Searching Authority	Signature of a qualified person	
ISA/US	Shawn P. Foley	

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1986)

International Application No. PCT/US87/00971

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM THE SECOND SHEET	
<input type="checkbox"/> OBSERVATIONS WHERE CERTAIN CLAIMS WERE FOUND UNSEARCHABLE The International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(b) for the following reasons: <input type="checkbox"/> Claim numbers because they relate to subject matter not recited in the preamble, namely: <input type="checkbox"/> Claim numbers because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements in such a way that no meaningful international search can be carried out, specifically: <input type="checkbox"/> OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING This International Searching Authority found the invention to be non-unity with the invention as claimed in the international application as follows: I. Claims 1-20, directed to a method of preparing a polyamide resin and the resin prepared therefrom: Class 525, subclass 379 See Attachment <input type="checkbox"/> As all required additional search fees were timely paid by the applicant, the International Search Report covers all searchable claims of the international application. Telephone Practice <input type="checkbox"/> As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims of the international application for which fees were paid, specifically claims: <input type="checkbox"/> No request for additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, the International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claim numbers: <input type="checkbox"/> As all searchable claims could be searched without effort exceeding an additional fee, the International Searching Authority did not issue payments of any additional fee. Remarks on Prior Art: <input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by sufficient prior art. <input type="checkbox"/> No prior art accompanied the payment of additional search fees.	
Form PCT/ISA/210 (Supplemental sheet 2) (July 1986)	

PCT/US87/00971

IN DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT (CONTINUED FROM THE SECOND SHEET)		
Category	Character of Document, if available, and location, where appropriate, of the relevant passages	Reasons for Class No.
P, X Y	The Journal of Biological Chemistry, Vol. 262, No. 12, issued 25 April 1987, Kennedy et al., "Use of a Resin-bound Synthetic Peptide for Identifying a Neutralizing Antigenic Determinant Associated with the Human Immunodeficiency Virus Envelope", pages 5769-5774, see Materials and Methods under <u>Solid-Phase Synthesis of Peptide</u> and Abstract.	1-4, 11, 12, 14-18, 27-29, 5-10, 13, 19, 20, 30
Y	Journal of The Chemical Society, Perkin Transactions 1, Vol. 2, issued 1981, Arshady et al., "Peptide Synthesis. Part 1. Preparation and Use of Polar Supports based on Poly(dimethylacrylate)", pages 529-537, see page 534.	1-20 and 30

Form PCT/ISA/210 (June 1988)

Attachment To Form PCT/ISA/210, Part VI.

- II. Claims 21-26, directed to a method of immunizing an animal with a polyamide-protide conjugate, Class 424, subclass 88.
- III. Claims 27-30, directed to a diagnostic product comprising a polyamide-protide conjugate and its method of use in an assay; Class 435, subclass 7 and Class 436, subclass 531.

PCT/US87/00971

Attachment To Form PCT/ISA/210, Part. VI.

Telephone approval:

\$280 payment approved by Mark Wisner on 10 June 1987 for groups II and III; charge to deposit Account No. 03-34-83. --Counsel is advised that he has no right to protest for any group not paid for and that any protest must be filed no later than 15 days from the date of mailing of the search report (Form 210).

Reasons for holding lack of unity of invention:

Group I, claims 1-20, drawn to a method of preparing a polyamide resin and the resin produced therefrom classified in Class 525, subclass 379 is not required for the methods of groups II and III. For example, the polyamide can be made via other procedures as shown by the prior art. They (polyamides) also have uses other than in solid-phase peptide synthesis. They are used in preparing soft contact lenses. Groups II and III require a polyamide-peptide conjugate which group I does not contain. Groups II and III are distinct methods of using the same product which is illustrated by their different classification.

Time Limit for Filing a Protest:

Applicant is hereby given 15 days from the mailing date of this Search Report in which to file a protest of the holding of lack of unity of invention. In accordance with PCT rule 40.2 applicant may protest the holding of lack of unity only with respect to the group(s) paid for.

第1頁の続き

⑨Int.Cl.⁴

C 08 F 220/56

220/58

G 01 N 33/531
33/545

識別記号

C G A
M N J
C G B
M N F

庁内整理番号

B-8620-4J

8620-4J
A-7906-2G
A-7906-2G

- ⑫発 明 者 ケネディ, ロナルド・シー アメリカ合衆国テキサス州78231, サン・アントニオ, インディア
ン・リッジ・ドライブ 2707
- ⑬発 明 者 スパロウ, ジェームス・ティー アメリカ合衆国テキサス州77035, ヒューストン, アトウエル 121
19
- ⑭出 願 人 ベイラー・カレッジ・オブ・メ アメリカ合衆国テキサス州77030, ヒューストン, ワン・ペイラ
ー・プラザ (番地なし)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.